

**THIS PAGE IS INSERTED BY OIPE SCANNING
AND IS NOT PART OF THE OFFICIAL RECORD**

Best Available Images

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

BLACK BORDERS

TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT

BLURRY OR ILLEGIBLE TEXT

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLORED PHOTOS HAVE BEEN RENDERED INTO BLACK AND WHITE

VERY DARK BLACK AND WHITE PHOTOS

UNDECIPHERABLE GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE THE BEST AVAILABLE
COPY. AS RESCANNING *WILL NOT*
CORRECT IMAGES, PLEASE DO NOT
REPORT THE IMAGES TO THE
PROBLEM IMAGE BOX.**

10637130
10/27/03

⑬ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭59—196738

⑩ Int. Cl.³
B 01 J 20/22
A 61 M 1/03

識別記号
1 0 1

庁内整理番号
7158—4G
6779—4C

⑬ 公開 昭和59年(1984)11月8日

発明の数 2
審査請求 未請求

(全 7 頁)

⑭ 吸着体およびその製造法

⑯ 発明者 林恒夫

芦屋市西山町3番1号

⑰ 特 願 昭58—70967

⑰ 出 願 人 鐘淵化学工業株式会社

⑱ 出 願 昭58(1983)4月21日

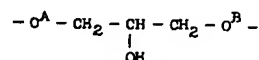
大阪市北区中之島3丁目2番4号

⑲ 発明者 谷紋孝

箕面市船場西2丁目11-1ロイヤル千里105号

⑳ 代理人 弁理士 朝日奈宗太

明 細 書



1 発明の名称

吸着体およびその製造法

2 特許請求の範囲

- 1 極限粘度が0.12dl/g以下でかつ硫酸含量が15重量%以上であるデキストラン硫酸および(または)その塩が水不溶性多孔体に共有結合を介して固定されてなる体外循環治療用リポ蛋白吸着体。
- 2 水不溶性多孔体の排除限界分子量が100万〜1億の範囲である特許請求の範囲第1項記載の吸着体。
- 3 水不溶性多孔体が多孔質セルロースゲルである特許請求の範囲第1項または第2項記載の吸着体。
- 4 デキストラン硫酸および(または)その塩が式:

(式中、O^Aはデキストラン硫酸および(または)その塩の水酸基に由来する酸素原子、O^Bは水不溶性多孔体の表面水酸基に由来する酸素原子である)で示される結合を介して水不溶性多孔体に固定されてなる特許請求の範囲第1項、第2項または第3項記載の吸着体。

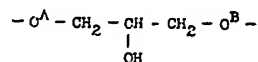
- 5 デキストラン硫酸および(または)その塩の固定量がカラム体積1mlあたり0.2mg以上である特許請求の範囲第1項、第2項、第3項または第4項記載の吸着体。
- 6 エポキシ化された水不溶性多孔体とデキストラン硫酸および(または)その塩とを反応させるにあたり、デキストラン硫酸および(または)その塩濃度を水不溶性多孔体(乾燥重量)を除く全反応系重量の3重量%以上としたことを特徴とする極限粘度が0.12dl/g以下でかつ硫酸含量が15重量%以上のデキストラン硫酸および(または)その塩が水不溶性

多孔体に共有結合を介して固定されてなる体外循環治療用リポ蛋白吸着体の製造法。

7 水不溶性多孔体の排除限界分子量が100万～1億の範囲である特許請求の範囲第6項記載の製造法。

8 水不溶性多孔体が多孔質セロースゲルである特許請求の範囲第6項または第7項記載の製造法。

9 デキストラン硫酸および(または)その塩が式：



(式中、 O^A はデキストラン硫酸および(または)その塩の水酸基に由来する酸素原子、 O^B は水不溶性多孔体の表面水酸基に由来する酸素原子である)で示される結合を介して水不溶性多孔体に固定されてなる特許請求の範囲第6項、第7項または第8項記載の製造法。

10 デキストラン硫酸および(または)その塩の固定量がカラム体積1mlあたり0.2mg以上で

ある特許請求の範囲第6項、第7項、第8項または第9項記載の製造法。

3 発明の詳細な説明

本発明は血液中の有害成分を除去するための吸着体に関する。さらに詳しくは血液あるいは血漿、血清中からリポ蛋白、とくに極低密度リポ蛋白(VLDL)および(または)低密度リポ蛋白(LDL)を選択的に吸着除去するための吸着体に関する。

血液中に存在するリポ蛋白のうちVLDL、LDLはコレステロールを多く含み、動脈硬化の原因となることが知られている。とりわけ家族性高脂血症などの高脂血症、高コレステロール症においては正常値の数倍のVLDLおよび(または)LDL値を示し、冠動脈の硬化などをひき起こす。これらの疾患の治療には食事療法、薬物療法が行なわれているが効果に限度があり、副作用も懸念されている。とくに家族性高脂血症に対してはVLDL、LDLを多く含んだ患者の血漿を分離

したのち、正常血漿またはアルブミンなどを成分とする補液と交換してVLDL値、LDL値を低下させる、いわゆる血漿交換療法が現在のところほぼ唯一の効果的な治療法である。しかしながら、血漿交換療法は周知のごとく、(1)高価な新鮮血漿あるいは血漿製剤を用いる必要がある、(2)肝炎ウイルスなどの感染の恐れがある、(3)有害成分のみでなく有用成分も同時に除去してしまう、すなわちリポ蛋白のばあい有用である高密度リポ蛋白(HDL)も同時に除去してしまうなどの欠点を有する。

以上の欠点を解消する目的で、膜による有害成分の選択的除去が試みられているが、選択性の点で満足できるものはいまだえられていない。また同じ目的で抗原、抗体などを固定した、いわゆる免疫吸着体を用いる試みがなされており、該方法は選択性の点ではほぼ満足できるものの、用いる抗原、抗体の入手が困難かつ高価であるという欠点を有する。

さらには、除去対象物質に特異的な親和性

(アフィニティー)を有する物質(以下、リガンドという)を担体に固定した、いわゆるアフィニティークロマトグラフィーの原理による吸着体も試みられている。該方法に用いられるリガンドは抗原、抗体などに比べれば入手しやすい物質が多いが、生体に由来する物質が多いため体外循環治療に用いるには滅菌操作などに対する安定性、価格、安全性などの点で満足しうるものはほとんどない。

本発明者らは以上のとき欠点を克服すべくさらに鋭意研究を重ねた結果、特定の粘度と硫酸含量を有するデキストラン硫酸および(または)その塩を水不溶性多孔体に共有結合を介して固定することによつて、高効率かつ安全に、しかも選択性よくリポ蛋白を吸着除去しうる体外循環治療用吸着体がえられることを見出し、本発明を完成するに至つた。

すなわち、本発明は極限粘度(1M食塩水溶液中、25℃で測定、以下同様)が0.12dl/g以下でかつ硫酸含量が15重量%以上、好ましくは15～

22重量%のデキストラン硫酸および(または)その塩が水不溶性多孔体に共有結合を介して固定されてなる体外循環治療用リポ蛋白吸着体およびその製造法に関する。

デキストラン硫酸および(または)その塩とはロイコノストック・メセンテロイデス(*Leuconostoc mesenteroides*)などにより生産される多糖であるデキストランの硫酸エステルおよび(または)その塩である。

デキストラン硫酸および(または)その塩がカルシウムなどの2価カチオンの存在下にリポ蛋白と沈殿を形成することが知られており、通常該目的には分子量が50万(極限粘度が約0.20dl/g)程度のデキストラン硫酸および(または)その塩が使用される。しかしながら、比較例に示すように叙上のごときデキストラン硫酸および(または)その塩を水不溶性多孔体に固定してもLDLおよび(または)VLDLの吸着能力は低く、実用に耐えない。本発明者らは種々検討を重ねた結果、極限粘度が0.12dl/g以下、より好ましくは0.08dl/g以下でかつ硫酸含量が15重量%以上のデキストラン硫酸および(または)その塩が高

いLDLおよび(または)VLDL吸着能力と選択性を示すことを見出した。さらに述べるべきことに、叙上のごとき沈殿法では10~40mmの2価カチオンを必要とするのに対し、本発明の吸着体では2価カチオンの添加を必ずしも行なわなくとも高い吸着能力と選択性を示すことが見出された。またデキストラン硫酸および(または)その塩の粘性は低い、分子量がある程度以上大きくなると粘性が増加することが知られており、この点からも極限粘度が0.12dl/g以下、より好ましくは0.08dl/g以下の比較的低分子量のデキストラン硫酸および(または)その塩を用いることによつて、固定されたデキストラン硫酸および(または)その塩が万が一脱離した際の危険を防止できる。さらには、デキストラン硫酸および(または)その塩は大部分が α -1,6-グリコシド結合であるので高圧蒸気滅菌などの操作を施しても変化が少ない。

デキストラン硫酸および(または)その塩の分子量の測定法には種々あるが、粘度測定によるのが一般的である。しかしながら、デキストラン硫酸および(または)その塩は高分子電解質であるため溶液のイオ

ン強度、pH、さらにデキストラン硫酸および(または)その塩の硫酸含量(すなわち、スルホン酸基の量)などによつて同じ分子量のものでも粘度が異なる。本発明でいう極限粘度とは、デキストラン硫酸および(または)その塩をナトリウム塩とし、中性の1M食塩水溶液中、25℃で測定したものである。

本発明に用いるデキストラン硫酸および(または)その塩は直鎖状でも分岐鎖状でもよく、塩としてはナトリウム、カリウムなどの水溶性塩が好ましい。

本発明に用いる担体の水不溶性多孔体としてはつぎの性質を備えていることが好ましい。

- (1)機械的強度が比較的高く、カラムなどに充填して、血液、血漿などの体液を流したばあいの圧力損失が小さく、目詰りなどをおこさない。
- (2)充分な大きさの細孔が多数存在すること、すなわち吸着除去対象物質が細孔内に侵入できることが必要であり、球状蛋白質およびウイルスを用いて測定した排除限界分子量が100万~1億の範囲である(ただし排除限界分子量とは細孔内に侵入できない(排除される)分子のうち最

も小さい分子量をもつものの分子量をいう)。

(3)表面に固定化反応に用いる官能基または容易に活性化しうる官能基、たとえばアミノ基、カルボキシル基、ヒドロキシル基、チオール基、酸無水物基、サクシニルイミド基、塩素基、アルデヒド基、アミド基、エポキシ基などが存在する。

(4)高圧蒸気滅菌などの滅菌操作による変化が少ない。

なお、(2)の球状蛋白質およびウイルスを用いて測定した排除限界分子量(以下、排除限界分子量という)に関しては、排除限界分子量100万未満の担体を用いたばあいはVLDL、LDLの除去量は小さく実用に耐えないが、排除限界分子量が100万~数百万とVLDL、LDLの分子量に近い担体でもある程度実用に供しうるものがえられる。一方、排除限界分子量が1億を超えると、リガンドの固定量が減少して結果的に吸着量が減り、またゲルの強度も低下するため好ましくない。かかる理由のため本発明に用いる水不溶性多孔体は排除限界分子量が100万~1億の範囲であることが適当である。

叙上のごとき性質を備えた水不溶性多孔体の代表例

としては、スチレン-ジビニルベンゼン共重合体、架橋ポリビニルアルコール、架橋ポリアクリレート、架橋されたビニルエーテル-無水マレイン酸共重合体、架橋されたスチレン-無水マレイン酸共重合体、架橋ポリアミドなどの合成高分子の多孔体や多孔質セルロースゲル、さらにはシリカゲル多孔質ガラス、多孔質アルミナ、多孔質ケイ酸カルシウム、多孔質ヒドロキシアパタイト、多孔質ケイ酸カルシウム、多孔質ジルコニア、ゼオライトなどの無機多孔体があげられるが、これらに限定されるわけではない。また水不溶性多孔体の表面は多糖類、合成高分子などでコーティングされていてもよい。

水不溶性多孔体の粒子径は一般的には小さい方が吸着能力の点で好ましいが、粒子径があまりに小さくなるとカラムに充填したばあいの圧力損失が大きくなり好ましくなく、1~5,000 μ の範囲であることが好ましい。また水不溶性多孔体は単独で用いてもよいし2種類以上混合して用いてもよい。

叙上の代表例の中でも多孔質セルロースゲルは前記(1)~(4)の性質を備えているばかりでなく、デキストラン硫酸および(または)その塩を効

率よく固定することができるため本発明にはも適した水不溶性多孔体のひとつである。

デキストラン硫酸および(または)その塩を水不溶性多孔体に固定する方法には種々あるが、体外循環治療に用いるにはリガンドが脱離しないことが重要であるので、リガンドが結合の強固な共有結合を介して水不溶性多孔体に固定されていることが望ましい。

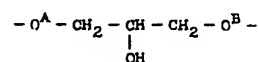
固定化方法の代表例としては、ハロゲン化シアン法、エピクロルヒドリン法、ビスエポキシド法、ハロゲン化トリアジン法などがあげられるが、結合が強固でリガンドの脱離の危険性が少ないエピクロルヒドリン法が最も本発明に適している。しかしながら、該エピクロルヒドリン法は反応性が低く、とくにデキストラン硫酸および(または)その塩を固定するばあいにはリガンドの官能基が水酸基であるためさらに反応性が低く、通常の方法では充分なリガンド固定量をうることは望しい。

本発明者らは種々検討の結果、エピクロルヒドリンで活性化されたエポキシ化水不溶性多孔

体とデキストラン硫酸および(または)その塩を反応させる工程において、デキストラン硫酸および(または)その塩の濃度(水不溶性多孔体(乾燥重量)を除く全反応系重量に対する濃度、以下同様)を重量%以上、より好ましくは10重量%以上に保つことによつて充分な量のデキストラン硫酸および(または)その塩が固定されることを見出した。デキストラン硫酸および(または)その塩の固定化量については、有意なりが蛋白吸着量をうるにはカラム体積1mlあたり0.2mg以上が好ましく、また経済性を考慮すると100mg以下が望ましい。

また、多孔質セルロースゲルを用いると他の水不溶性多孔体に比べ、同じ条件でもデキストラン硫酸および(または)その塩の固定化量が多く、好都合である。

エピクロルヒドリンにより活性化された水不溶性多孔体とデキストラン硫酸および(または)その塩との反応でえられる吸着体は、デキストラン硫酸および(または)その塩が式：



(式中、 O^A はデキストラン硫酸および(または)その塩の水酸基に由来する酸素原子、 O^B は水不溶性多孔体の表面水酸基に由来する酸素原子)で示される結合を介して水不溶性多孔体に固定されている。

なお、固定化反応終了後未反応のデキストラン硫酸および(または)その塩は回収して精製などの工程を経て再使用することもできる。

本発明による吸着体を体外循環治療に用いるには種々の方法があるが、入口と出口に体液成分(血球、蛋白質など)は通過するが吸着体は通過できないフィルター、メッシュなどを装着したカラムに充填し、該カラムを体外循環回路に組み込み、血液、血漿などの体液をカラムに通して行なう方法が代表的である。

つぎに実施例をあげて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はかかる実施例のみに限定されるわけではない。

比較例 1

セルロフアインA-3 (チッソ製) の多孔質セルロースゲル、排除限界分子重 50,000,000、粒子径 $45 \sim 105 \mu\text{m}$) 10ml に 20% NaOH 4g、ヘプタン 12g およびノニオン系界面活性剤トウイーン (Tween) 20 を 1 滴加え、 40°C で 2 時間攪拌後エピクロルヒドリン 5g を加えて 2 時間攪拌した。静置後上澄みを捨て、ゲルを水洗滌剤としてエポキシ化セルロースゲルをえた。

つぎに LDL 沈殿用として市販されている極限粘度 0.20dl/g 、平均重合度 (原料デキストランの平均重合度、以下平均重合度という) 3,500、硫黄含量 17.7 重量% のデキストラン硫酸ナトリウム 0.5g を水 2ml に溶解し、これに叙上のごとくしてえられたエポキシ化セルロースゲル 2ml を加え、 pH 12 に調整した (デキストラン硫酸ナトリウムの濃度は約 10 重量%)。これを 40°C で 16 時間振とう後ゲルを浮別し、 2M 食塩水、 0.5M 食塩水、水で洗浄し、デキストラン硫酸ナトリウムが固定化されたセルロースゲルをえた。固定されたデ

キストラン硫酸ナトリウムの量はカラム体積

1ml あたり 4.2mg であった。

比較例 2

デキストラン硫酸ナトリウムを極限粘度 0.124dl/g 、平均重合度 140、硫黄含量 5.7 重量% のものにかえたほかは比較例 1 と同様にしてデキストラン硫酸ナトリウムが固定されたセルロースゲルをえた。固定されたデキストラン硫酸ナトリウムの量はカラム体積 1ml あたり 2.5mg であった。

実施例 1

デキストラン硫酸ナトリウムとして、

- (1) 極限粘度 0.027dl/g 、平均重合度 12、硫黄含量 17.7 重量%
 - (2) 極限粘度 0.055dl/g 、平均重合度 40、硫黄含量 19 重量%
 - (3) 極限粘度 0.083dl/g 、平均重合度 140、硫黄含量 19.2 重量%
 - (4) 極限粘度 0.118dl/g 、平均重合度 270、硫黄含量 17.7 重量%
- の 4 種類を用い、比較例 1 と同様にしてデキストラン硫酸ナトリウムが固定されたセルロースゲルをえた。固定されたデキストラン硫酸ナトリウムの量はカラム体積 1ml あたりそれぞれ 2.0mg 、 1.5mg 、 4.0mg 、 4.3mg であった。

実施例 2

架橋ポリアクリレートゲルであるトヨパール HW65 (東洋曹達製) 排除限界分子重 5,000,000、粒子径 $50 \sim 100 \mu\text{m}$) 10ml に飽和 NaOH 水溶液 6ml 、エピクロルヒドリン 15ml を加え、攪拌しながら 50°C で 2 時間反応させたのち、ゲルをアルコール、水で洗浄してエポキシ化されたゲルをえた。

えられたゲル 2ml に極限粘度 0.055dl/g 、平均重合度 40、硫黄含量 19 重量% のデキストラン硫酸ナトリウム 0.5g および水 2ml を加えた (デキストラン硫酸ナトリウムの濃度は約 13 重量%)。ついで pH 12 に調整し、 40°C で 16 時間振とうし、ゲルを浮別し、 2M 食塩水、 0.5M 食塩水、水で洗浄してデキストラン硫酸ナトリウムが固定されたゲルをえた。固定されたデキストラン硫酸ナトリウムの量はカラム体積 1ml あたり 0.4mg であった。

実施例 3

極限粘度 0.055dl/g 、平均重合度 40、硫黄含量 19 重量% のデキストラン硫酸ナトリウムを用い、

固定化反応におけるデキストラン硫酸ナトリウムの濃度を 2.5 重量% にかえたほかは比較例 1 と同様にしてデキストラン硫酸ナトリウムが固定されたゲルをえた。固定されたデキストラン硫酸ナトリウムの量はカラム体積 1ml あたり 0.15mg であった。

試験例

比較例 1 ~ 2、実施例 1 ~ 3 でえられたデキストラン硫酸ナトリウムが固定されたゲルのそれぞれ 1ml をカラムに充填し、高脂血症患者の血漿 (総コレステロール濃度 300mg/dl) 6ml を流し、吸着された LDL の量を総コレステロールを指標として測定した (用いた血漿中のコレステロールはほとんどが LDL に由来するため)。

結果を第 1 表に示す。



表 1

デキストラン硫酸 ナトリウム 吸着量 ($\mu\text{g/g}$)	硫酸含量 (重量%)	デキストラン硫酸 ナトリウム 吸着量 ($\mu\text{g/g}$)	水不溶性多孔体	カラム体積1mlあたりのデキストラン硫酸ナトリウムの固定量(mg)	カラム通過前後のコレステロール値(mg/dl)
比較例1	0.20	約 10	セロファインA3	4.2	247
" 2	0.124	"	"	2.5	250
実施例1- (1)	0.027	"	"	2	115
" (2)	0.055	"	"	1.5	150
" (3)	0.083	"	"	4.0	167
" (4)	0.118	"	"	4.3	183
実施例2	0.055	13	トヨセル ER65	0.4	175
実施例3	0.055	2.5	セロファインA3	0.15	203

実施例 4

実施例 1 でえられた吸着体のうち、極限粘度 0.027dl/g 、平均重合度 12、硫酸含量 17.7 重量% のデキストラン硫酸ナトリウムを固定したものを生理食塩水中に分散させた状態で 120°C 20 分間高圧蒸気滅菌を施し、実施例 3 と同様にして LDL の吸着量を測定したところ、滅菌操作による吸着量の減少はわずかであった。

実施例 5

実施例 1 でえられた吸着体のうち、極限粘度 0.027dl/g 、平均重合度 12、硫酸含量 17.7 重量% のデキストラン硫酸ナトリウムを固定したものを 1ml をカラムに充填し、これに正常ヒト血漿 (LDL コレステロールと HDL コレステロールの比が約 1 : 1) 6ml を通したところ、LDL は大幅に減少したが、HDL はほとんど吸着されなかった。

実施例 6

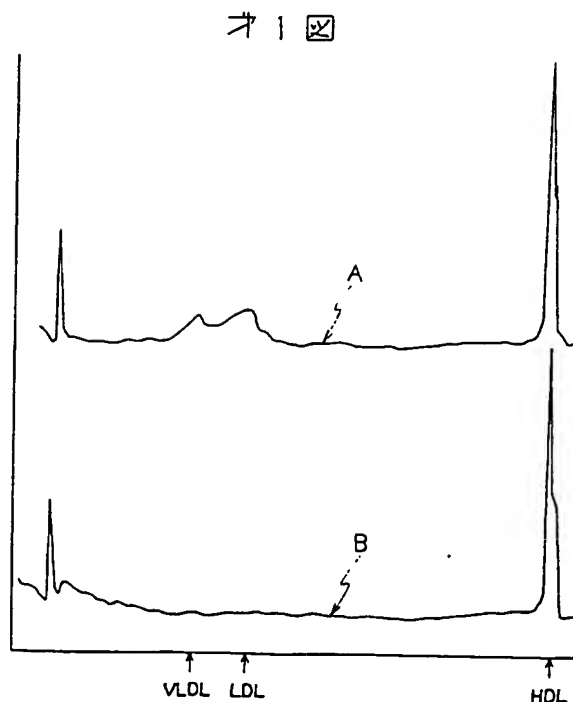
実施例 5 で用いた吸着体 1ml をカラムに充填し、これに VLDL、LDL、HDL を含む正常ウサギ

の血漿 6ml を通し、カラム通過前後での血漿中のリポ蛋白をポリアクリルアミドゲルを用いたディスク電気泳動法で調べた。第 1 図はその結果を示すチャートである。第 1 図中、曲線 A および B はそれぞれカラム通過前、通過後の電気泳動の結果であり、縦軸は 570nm における吸光度、↑ はそれぞれ VLDL、LDL、HDL のバンドが出現した位置を示す。

第 1 図に示すごとく、VLDL、LDL は吸着されたが、HDL はほとんど吸着されなかった。

4 図面の簡単な説明

第 1 図はポリアクリルアミドゲルを用いたディスク電気泳動の結果を示すチャートである。



手 続 補 正 書 (自発)

5 補正の対象

昭和 58 年 10 月 5



(1) 明細書の「発明の詳細な説明」の欄

特許庁長官 若 杉 和 夫 殿

6 補正の内容

1 事件の表示

昭和 58 年特許願第 70967 号

(1) 明細書14頁9行の「もできる。」のつぎに
改行してつぎの文章を挿入する。

2 発明の名称

吸着体およびその製造法

「デキストラン硫酸を固定したのち、未反応の活性基(エピクロルヒドリンを用いたばあいはエポキシ基)はモノエタノールアミンなどで封止しておくのが望ましい。」

3 補正をする者

事件との関係 特許出願人

(2) 同15頁末行の「をえた。」のつぎに「未反応のエポキシ基はモノエタノールアミンを用いて封止した。」を挿入する。

住 所 大阪市北区中之島三丁目2番4号

名 称 (094) 細端化学工業株式会社

代表者 高 田 敏

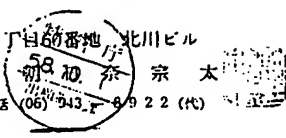
(3) 同17頁15行の「をえた。」のつぎに「未反応のエポキシ基はモノエタノールアミンを用いて封止した。」を挿入する。

4 代 理 人 〒540

住 所 大阪市東区京橋3丁目5番地 北川ビル

氏 名 (6522) 弁理士 初 田 宗 太

電話 (06) 543-4922 (代)



以 上